

Afdeling Organische Contaminanten/

Bestrijdingsmiddelen

RAPPORT 84.39

Datum: 1984-05-13

Pr.nr. 505.0421

Onderwerp: De herhaalbaarheid en reproducteerbaarheid van de aflatoxine B<sub>1</sub> bepaling in rundveevoeders.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd, afdeling Organische Contaminanten/Bestrijdingsmiddelen (4x), afdeling Normalisatie (Humme), projektbeheer, projekteider, LAC-Stuurgroep Zuivelverontreiniging (15x).

RAPPORT 84.39

Datum: 1984-05-13

Pr.nr. 505.0421

Projekt: Ontwikkeling en verbetering van analysemethoden voor het  
bepalen van aflatoxine.

Onderwerp: De herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de aflatoxine  
B<sub>1</sub> bepaling in rundveevoeders.

---

Doel:

Inzicht te krijgen op de invloed van de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de aflatoxine B<sub>1</sub> bepaling in rundveevoeders op de afkeuringsgrens.

Samenvatting/Conclusie:

In dit rapport wordt een beschouwing gegeven over de invloed van de variatie in de aflatoxine B<sub>1</sub> bepaling volgens de EEG-methode op de afkeuringsgrens.

De variatiecoëfficiënt berekend uit de herhaalbaarheid van de EEG-methode voor gehalten kleiner dan 20 µg/kg bedraagt 22% (n=16). De variatiecoëfficiënt berekend uit de reproduceerbaarheid is geschat op 44%. Dit betekent dat bij een duplo analyse in één laboratorium uitgevoerd door dezelfde analist de afkeuringsgrens 19 µg/kg is.

De variatiecoëfficiënt berekend uit de herhaalbaarheid voor de HPLC methode voor gehalten kleiner dan 20 µg/kg bedraagt 25% (n=20). Dit is in overeenstemming met de verwachtingen en zal daardoor in dit opzicht geen wezenlijke bijdrage tot verlaging van de afkeuringsgrens opleveren.

Echter daar de herhaalbaarheid en waarschijnlijk ook de reproduceerbaarheid voor beide methoden vergelijkbaar is, kan bij een duplo analyse met beide methoden (dus EEG + HPLC) als afkeuringsgrens 16 µg/kg gehanteerd worden.

---

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Medewerkers/Samenstellers: A.H. Roos, W.A. Traag, G.A. Werdmuller

Projektleider: W.A. Traag

### Inleiding

Het maximum toelaatbare gehalte aan aflatoxine B<sub>1</sub> in rundveevoeders is recentelijk verlaagd van 20 naar 10 µg/kg met als doel verlaging van de aflatoxine M<sub>1</sub> besmetting van zuivelprodukten.

Voor het vaststellen van overschrijdingen van het maximum toelaatbare gehalte dient officieel de EEG-methode (lit. 1) gebruikt te worden.

Bij het analyseren van monsters met als doel het vaststellen van overschrijdingen wordt in het algemeen de controlerende instantie geconfronteerd met het probleem dat de analyse-uitslag aan een zekere onnauwkeurigheid is blootgesteld.

Om dat probleem uniform te benaderen adviseert ISO 5725 (lit. 2) de volgende algemene aanpak.

$$x - T > 2 \times V(\text{gem}) \times \frac{T}{100}$$

waarin

$x$  = gemiddelde gemeten gehalte

$V(R)$  = variatiecoëfficiënt tussen laboratoria

$V(r)$  = variatiecoëfficiënt in een laboratorium

$k$  = aantal laboratoria

$n$  = aantal analyses

$T$  = maximum toelaatbare gehalte.

$$V_{\text{gem}} = \frac{V^2(R)}{k} - \frac{(n-1)}{k \cdot n} V^2(r)$$

In een aantal gevallen, waaronder bovengenoemde EEG-methode, geeft de wetgever in het analysevoorschrift aan wat de te verwachten herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid ongeveer zijn, dit met het doel niet ten onrechte monsters af te keuren (zgn. vals-positieven).

### EEG-methode

Voor gehalten kleiner dan 20 µg/kg bedroeg in 1983 de variatiecoëfficiënt van de herhalingen  $V(r)$  uitgevoerd door één analist op dezelfde dag 22%. Deze  $V(r)$  is berekend uit 16 duplo's. Voor gehalten tussen 20 en 50 µg/kg is de  $V(r)$ , berekend uit 29 duplo's, 12%.

In de EEG-methode wordt voor de herhaalbaarheid aangegeven dat het verschil tussen de resultaten van twee door dezelfde analist aan hetzelfde monster uitgevoerde parallele bepalingen niet meer zou mogen bedragen dan 25% van de hoogste waarde bij aflatoxine B<sub>1</sub> gehalten van 10 tot en met 20 µg/kg.

Deze eis werd dan ook gehandhaafd bij de interpretatie van de resultaten van door ons verrichte duplobepalingen.

Als vuistregel kan aangehouden worden dat de reproduceerbaarheid V(R) tussen laboratoria tenminste een faktor 2 groter is dan de herhaalbaarheid V(r) (lit. 3).  $V(R) = 2 V(r)$ .

Uitgaande van een V(r) van 22% is dus V(R) 44%. Voor gehalten kleiner dan 20 µg/kg geldt bij gebruik van bovengenoemde formule voor n analyses in k laboratoria dat

$$x - 10 > 2 \frac{(44)^2}{k} - \frac{(n-1)}{k \cdot n} 22^2 \times \frac{10}{100}$$

d.w.z. een monster dat aan dit criterium voldoet heeft een kans van 2,5% om ten onrechte te worden afgekeurd.

In onderstaande tabel is aangegeven het effect van n analyses in k laboratoria op de afkeuringsgrens.

Aantal labs (k)	Aantal analyses (n)	V(gem) in %	Afkeuren bij gehalte groter dan .... µg/kg
1	1	44,0	18,8
1	2	41,2	18,2
1	3	40,2	18,0
1	4	39,7	17,9
2	1	31,1	16,2
2	2	29,1	15,8
2	3	28,4	15,7
2	4	28,0	15,6
3	1	25,4	15,1
3	2	23,8	14,8
4	1	22,0	14,4
4	2	20,6	14,1



Voor duplo-analyse in één laboratorium ligt de afkeuringsgrens bij 19 µg/kg.

Verder blijkt dat veel deelmonsters in een laboratorium vlak na elkaar geanalyseerd, de variatiecoëfficiënt van het gemiddelde ( $V(\text{gem})$ ) nauwelijks beïnvloedt.

Indien  $p$  monsters uit de monsterstroom van een fabriek geanalyseerd worden op verschillende tijdstippen gedurende een dag dan komt de spreiding in het monster er nog bij en wordt  $V(\text{gem})$  dus nog groter. Maakt men van de  $p$  monsters één homogeen monster dan geldt bovenstaande tabel voor de tijdsduur van de monsterstroom.

Analyse op meerdere laboratoria levert meer op. Het meest gunstige is dus een aantal monsters homogeniseren tot één monster en door 4 laboratoria in duplo laten analyseren. De afkeuringsgrens ligt dan bij 14 µg/kg aflatoxine  $B_1$ . Het is echter niet gebruikelijk om op meerdere laboratoria te analyseren.

De in bovenstaande tabel gehanteerde reproduceerbaarheid  $V(R)$  van 44% ligt in de grootte orde van de in de EEG-methode gestelde eis voor de reproduceerbaarheid van de resultaten tussen laboratoria. Deze stelt als eis maximaal  $\pm 50\%$  van de gemiddelde waarde in aflatoxine  $B_1$  bij gemiddelde waarden van 10 tot en met 20 µg/kg.

De  $V(R)$  van 44% wordt ondersteund door een ringtest van het International Agency for Research on Cancer te Lyon waarin voor een check sample mais met aflatoxine  $B_1$  een  $V(R)$  van 32% met de EEG-methode wordt gevonden. Deze matrix is weliswaar niet vergelijkbaar met rundveevoeder, maar geeft wel aan dat de  $V(R)$  voor de aflatoxine  $B_1$  bepaling in rundveevoeder, een gecompliceerde matrix, in de orde van 40% zal liggen (lit. 4).

De  $V(R)$  wordt tevens ondersteund door de in fig. 1 gegeven grafische weergave van het verloop van de  $V(R)$  in relatie tot het gehalte (lit. 5). Uit deze figuur is ook af te leiden dat voor gehalten op het µg/kg niveau de  $V(R)$  in de orde van 40% ligt.

#### HPLC methode

In RIKILT rapport 84.9 is de analytische problematiek met de EEG-methode beschreven. Zoals bekend (lit. 6) werd al vele jaren door het RIKILT een modificatie toegepast om het aflatoxine  $B_1$  gehalte in aanwezigheid van citrus componenten te kunnen bepalen.

Als dit niet gedaan zou worden was het aflatoxine B<sub>1</sub> gehalte in zijn geheel niet te bepalen, zoals ook al in het officiële EEG voorschrift is aangegeven.

Om vooral de problemen met de EEG-methode rond de detectiegrens te elimineren is een HPLC methode ontwikkeld (lit. 7) die bovendien als voordelen heeft veel sneller en dus goedkoper te zijn en geen interferenties met citruscomponenten te vertonen.

Van deze methode mag niet verwacht worden dat de herhaalbaarheid V(r) en de reproduceerbaarheid V(R) gunstiger zullen liggen als voor de EEG methode. Dit wordt ook experimenteel bevestigd.

Uit de herhalingen uitgevoerd door één analist op verschillende dagen was voor gehalten kleiner dan 20 µg/kg een V(r) van 25% (n=20) en voor gehalten groter dan 20 µg/kg een V(r) van 17% (n= 40) te bepalen.

Daar de herhaalbaarheid voor de HPLC methode in dezelfde orde ligt als de herhaalbaarheid voor de EEG-methode, mag in de formule op blz. 1 voor het aantal laboratoria ook het aantal methoden ingevuld worden. Dit betekent dat bij een duplo analyse met de HPLC methode en een duplo analyse met de EEG-methode in hetzelfde laboratorium, indien uitgevoerd in vier verschillende submonsters van het monster, de afkeuringsgrens bij 16 µg/kg ligt.

#### Literatuur

1. Publikatieblad nr. L 102/8-18 (15.4.76) van de Europese Gemeenschappen. Zevende richtlijn van de commissie van 1 maart 1976 houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders (76/372/EEG).
2. ISO 5725-first edition-1981-04-01 - Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility by inter-laboratory tests.
3. W. Horwitz, JAOAC 60 (1977) 1355-1363.
4. Preliminary report on the statistical analysis of results obtained for the analysis of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>; IARC 1983.
5. W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, JAOAC 63 (1980) 1344-1354.
6. L.G.M.Th. Tuinstra, C.A.H. Verhulsdonk, J.M. Bronsgeest en W.E. Paulsch, Neth. J. Agric. Sci 23 (1975) 10-17.
7. L.G.M.Th. Tuinstra en W. Haasnoot. J. of Chromatography 282 (1983) 457-462.